

Skrining Antibakteri Produk Ekstrasel Eksosimbion Bakteri Laut pada Makroalga Terhadap Biofilm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Antibacterial Screening of Extracell Product of Macroalgae Exosymbiont Marine Bacteria Againts Staphylococcus aureus ATCC 25923 Biofilm

Sri Agung Fitri K^{1*}, Mochamad Untung K. Agung,² dan Josi Meika¹

Fakultas Farmasi¹ dan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan²
Universitas Padjadjaran Bandung
Email-korespondensi : safk0409@gmail.com

Abstrak

Kemampuan *Staphylococcus aureus* dalam membentuk biofilm dapat meningkatkan sifat virulensi dan resistensinya terhadap antibiotik yang selama ini efektif digunakan. Penemuan kandidat antibakteri terhadap biofilm tersebut dapat menjadi solusi untuk mengatasi infeksi *S.aureus*. Bakteri yang bersimbiosis dengan makroalga telah diketahui menghasilkan senyawa antibiotik terhadap bakteri patogen. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh isolat bakteri eksosimbion makroalga yang mengandung produk ekstrasel yang dapat bekerja sebagai antibakteri terhadap biofilm *S.aureus*. Tahapan metode yang dilakukan adalah pengambilan dan determinasi bahan makroalga yang diperoleh dari Pantai Santolo, Kab.Garut, isolasi dan pemurnian bakteri eksosimbion pada makroalga dengan metode pulas, isolasi produk ekstrasel bakteri dengan metode sentrifugasi, skrining aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus* plankton dengan metode difusi agar dan terhadap biofilm menggunakan metode turbidimetri dengan pewarnaan kristal violet. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari tiga jenis makroalga, diperoleh 17 isolat koloni tunggal yang memiliki warna dan morfologi koloni yang berbeda. Dari 17 isolat tersebut diperoleh lima isolat koloni, yaitu isolat 9,10,11,12,dan 13, yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus* ATCC 25923 plankton dan satu isolat koloni, yaitu isolat 9, yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bentuk biofilmnya.

Kata kunci : *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Bakteri eksosimbion, Makroalga, pantai santolo

Abstract

Staphylococcus aureus is capable of forming a biofilm to increase its virulence and resistance to all-time effective antibiotics. The discovery of antibacterial candidates against the biofilm can be the solution to oppose the S.aureus infection. Symbiotic bacteria with macroalgae is known to produce antibiotic compound againts pathogenic bacteria. The purpose of this research is to obtain the exosymbiotic bacteria-macroalgae isolates containing extracelullar products with antibacterial ability againts S.aureus biofilm. The methods included collecting and determining macroalgae properties obtained from Santolo Beach, Garut, isolating and purifying the exosymbiotic bacteria in macroalgae using swab method, isolating the extracelullar bacterial products by centrifugation, antibacterial activity screening towards planktonic S.aureus with agar diffusion method and towards its biofilm using turbidimetric method with crystal violet staining. The results shown there were 17 isolates of single colony that have different color and morphology. Amongst the 17 isolates, five colonial isolates were obtained; isolate 9, 10, 11, 12, and 13, with antibacterial activity against planktonic S.aureus ATCC 25923, whilst one colonial isolate was obtained; isolate 9 to which it possesed antibacterial activity against the biofilm form.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Exosymbiotic bacteria, Macroalgae

Pendahuluan

Staphylococcus aureus merupakan bakteri patogen oportunistik yang banyak ditemukan pada kulit dan permukaan mukosa pada orang normal. *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab infeksi luka dan berpotensi untuk menginduksi terjadinya osteomyelitis, endokarditis, dan bakteremia, serta menyebabkan infeksi pada organ-organ utama tubuh lainnya (Daum, 2008). Beberapa penyakit tersebut dilaporkan disebabkan adanya pembentukan biofilm *S.aureus*. Dengan demikian, kemampuannya dalam membentuk biofilm merupakan salah satu faktor virulensi yang patut diperhatikan (Yarwood *et al.*, 2007; O'Toole *et al.*, 2000).

Dilaporkan bahwa pengobatan infeksi *S.aureus* yang terkait dengan pembentukan biofilm sulit diobati dengan antibiotik standar (Ceri *et al.*, 1999) maupun sistem kekebalan tubuh (Donlan and Costerton, 2002; Leid *et al.*, 2002; Shiau and Wu, 1998). *Staphylococcus aureus* dalam bentuk biofilm diketahui memiliki tingkat resistensi yang lebih tinggi terhadap antibiotik dibandingkan dengan bentuk plankton (Ruiz *et al.*, 2012; Nishimura *et al.*, 2006). Untuk mengatasi masalah tersebut, maka perlu dilakukan pencarian senyawa antibakteri baru yang efektif terhadap biofilm dengan memanfaatkan potensi antibakteri dari bakteri lain. Pada penelitian ini, digunakan isolat koloni bakteri yang berkolonisasi (eksosimbion) pada makroalga sebagai kandidat antibakteri terhadap biofilm *S.aureus*.

Bakteri yang terdapat pada permukaan makroalga hidup dalam lingkungan yang sangat kompetitif dalam mendapatkan nutrisi. Dilaporkan bahwa bakteri simbiosis tersebut menghasilkan senyawa antibiotik yang lebih banyak dibandingkan dengan bakteri yang hidup bebas di air laut (Lemos *et al.*, 1986; Zheng *et al.*, 2005). Sebagai contoh, bakteri eksosimbion yang terdapat pada alga merah (Ali *et al.*, 2011; Manmadhan *et al.*, 2007)

dan alga coklat (Manmadhan *et al.*, 2006) dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen pada manusia. Bakteri yang bersimbiosis dengan makroalga juga dilaporkan melepaskan senyawa bioaktif yang dapat melindungi makroalga dari *fouling*, yang merupakan biofilm alami di laut (Armstrong *et al.*, 2001). Data-data tersebut dapat dijadikan dasar dalam penelitian skrining antibakteri terhadap biofilm *Staphylococcus aureus* melalui pemanfaatan eksosimbion bakteri pada makroalga.

Bahan dan Metode

Alat

Alat-alat yang digunakan adalah 96-well microtiter plates, penangas air, neraca analitik (Mettler Toledo, Dragon 204), otoklaf (Hirayama), oven (Mettmert 200 dan Metmert 400-800), inkubator (Sakura IF-4), sentrifugator (Sartorius), kapas, lemari pendingin, mikropipet volume 10-100 µL (Biohit), mikropipet volume 100-1000 µL (Boeco), mikropipet 0,2-2 µL (Propette), tabung sentrifuga 1,5 mL (Eppendorf), vortex mixer (Health), tip mikropipet, Ose, pembakar spiritus, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di Laboratorium Mikrobiologi.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri eksosimbion yang diisolasi dari tiga jenis makroalga di Pantai Santolo, Kab.Garut, Jawa Barat. Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari PT. Biofarma, Bandung. Media bakteri yang digunakan adalah Nutrient Agar (NA – Oxoid), Nutrient Broth (NB – Pronadisa), Mueller Hinton Agar (MHA – Pronadisa), Mueller Hinton Broth (MHB – Oxoid), dan Tryptic Soy Broth (TSB – Pronadisa). Bahan kimia yang digunakan adalah natrium klorida (NaCl - Merck), NaCl fisiologis 0,9% steril

(Widata), kalium klorida (KCl - Merck), natrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4 - Merck), kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4 - Merck), barium klorida (BaCl_2 - Unichem), asam sulfat (H_2SO_4 - Merck), kristal violet, air laut, dan air suling.

Metode

Pengambilan dan Determinasi Makroalga

Makroalga yang digunakan diambil dari Pantai Santolo, Kab. Garut. Pada saat pengambilan sampel dilakukan pengukuran parameter fisik lingkungan, yaitu temperatur, pH, dan salinitas. Determinasi makroalga dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan dan Herbarium Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung, Bandung.

Isolasi Bakteri Eksosimbion

Isolasi bakteri eksosimbion dilakukan dengan metode pulas. Potongan thallus makroalga ditempatkan di dalam botol sampel steril yang berisi larutan NaCl fisiologis pada saat pengambilan sampel di lapangan. Potongan thallus makroalga dipulas dengan lidi kapas steril kemudian disuspensikan ke dalam 10 ml NaCl fisiologis steril lalu dihomogenkan. Setelah itu diencerkan hingga enam kali pengenceran. Pada tiga pengenceran terakhir, sebanyak 50 μl suspensi ditebar di atas 20 mL media *Marine Agar* (MA) steril padat yang terbuat dari NA dan air laut (28 gr NA dalam 1 liter air laut). Suspensi bakteri eksosimbion diratakan menggunakan *spreader*, lalu diinkubasi pada suhu 30 °C selama 1-3 hari. Setelah itu dilihat perbedaan morfologi koloni yang tumbuh. Masing-masing koloni tersebut kemudian dipisahkan dengan menggoreskan setiap koloni yang berbeda sebanyak 1 Ose pada cawan petri yang berisi media MA steril kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam. Proses ini dilakukan berulang hingga didapat isolat koloni tunggal murni. Identifikasi awal

terhadap isolat koloni tunggal adalah berupa pengamatan morfologi, yaitu bentuk, warna dan struktur koloni, serta pengamatan bentuk sel menggunakan metode pewarnaan sederhana.

Metode pewarnaan sederhana dilakukan dengan cara menggoreskan 1 Ose suspensi isolat bakteri eksosimbion pada kaca objek steril, lalu difiksasi dengan cara dilewatkan di atas api hingga terbentuk lapisan putih kering. Olesan tersebut kemudian ditetesi zat warna kristal violet dan dibiarkan selama 2 menit. Zat warna yang berlebih kemudian dibilas dengan air suling hingga air bilasan menjadi pucat. Preparat dikeringkan menggunakan kertas saring, setelah itu dilihat bentuk sel bakteri di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 100x.

Isolasi Produk Ekstrasel Isolat Bakteri Eksosimbion

Isolasi produk ekstrasel isolat bakteri eksosimbion dilakukan dengan cara sentrifugasi. Masing-masing isolat koloni bakteri diinokulasi sebanyak 2 Ose ke dalam 5 ml media *Marine broth* (MA) steril yang terbuat dari NA dan air laut. Suspensi bakteri tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama satu hingga tujuh hari. Suspensi bakteri yang didapat dari hari kesatu hingga hari ketujuh dibandingkan kekeruhannya dengan standar McFarland. Tingkat kekeruhan tersebut berhubungan dengan fase pertumbuhan isolat bakteri eksosimbion, dimana fase yang diharapkan adalah fase stasioner. Fase stasioner tercapai saat terjadi tingkat kekeruhan suspensi yang konstan saat dibandingkan dengan standar McFarland. Suspensi bakteri kemudian disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. Supernatannya kemudian diambil untuk dilakukan uji skrining aktivitas antibakteri terhadap bakteri plankton dan biofilm *S.aureus* ATCC 25923.

Skrining Aktivitas Antibakteri Produk Ekstrasel Isolat Bakteri Eksosimbion Terhadap Bakteri Plankton S.aureus

Skrining aktivitas antibakteri produk ekstrasel isolat bakteri eksosimbion terhadap bakteri plankton *S.aureus* ATCC 25923 ini dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan teknik perforasi. Bakteri *S.aureus* ATCC 25923 diinokulasi sebanyak 1 Ose ke dalam 5 ml media MHB steril lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri kemudian diencerkan hingga kekeruhan suspensi bakteri sama dengan kekeruhan McFarland 0,5. Sebanyak 20 µl suspensi bakteri dimasukkan ke dalam cawan petri steril lalu ditambahkan 20 ml media MHA steril dengan suhu 40-45°C, dihomogenkan, lalu dibiarkan hingga memadat. Setelah itu, lempeng agar yang sudah mengandung bakteri dilubangi menggunakan perforator. Tiap lubang diisi produk ekstrasel isolat bakteri dari hari kesatu hingga hari ketujuh, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam, lalu dilihat zona hambat yang terbentuk. Hasil ini kemudian dijadikan acuan pada uji skrining aktivitas terhadap biofilm *S.aureus* ATCC 25923.

Skrining Aktivitas Antibakteri Produk Ekstrasel Isolat Bakteri Eksosimbion Terhadap Biofilm S.aureus

Skrining aktivitas antibakteri produk ekstrasel isolat bakteri eksosimbion terhadap biofilm *S.aureus* ini dilakukan menggunakan metode turbidimetri dengan pewarnaan kristal violet. Bakteri *S.aureus* ATCC 25923 diinokulasi sebanyak 1 Ose ke dalam 5 ml media TSB steril lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri tersebut kemudian diencerkan hingga kekeruhan suspensi bakteri sama dengan kekeruhan McFarland 0,2. Media TSB steril didistribusikan ke dalam 96-well microtiterplate sebanyak 200µl/sumur, lalu ditambahkan suspensi bakteri *S.aureus* ATCC 25923 sebanyak 0,2 µl/sumur, kemudian diinkubasi pada suhu

37°C selama 24 jam. Pada penelitian ini disiapkan kontrol positif yang terdiri dari 200 µl media TSB steril dan 0,2 µl suspensi bakteri serta kontrol negatif yang hanya terdiri dari 200 µl media TSB steril. Supernatan didekantasi secara perlahan dari sumur sehingga terpisah dari endapannya.

Sebanyak 100 µl produk ekstrasel masing-masing isolat bakteri eksosimbion dan 100 µl media dimasukkan ke dalam setiap sumur, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada kontrol positif dan kontrol negatif hanya ditambahkan 200 µl media TSB steril. Supernatan dalam masing-masing sumur didekantasi sehingga terpisah dari endapannya. Pada endapan yang terdapat pada dasar sumur kemudian dilakukan uji konfirmasi daya bunuh terhadap biofilm *S.aureus* menggunakan agar tegak setengah padat. Ose ujung lurus yang telah steril ditusukkan ke dalam endapan, kemudian ditusukkan kembali ke dalam media MHA tegak setengah padat steril, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk dilihat adanya pertumbuhan bakteri atau tidak.

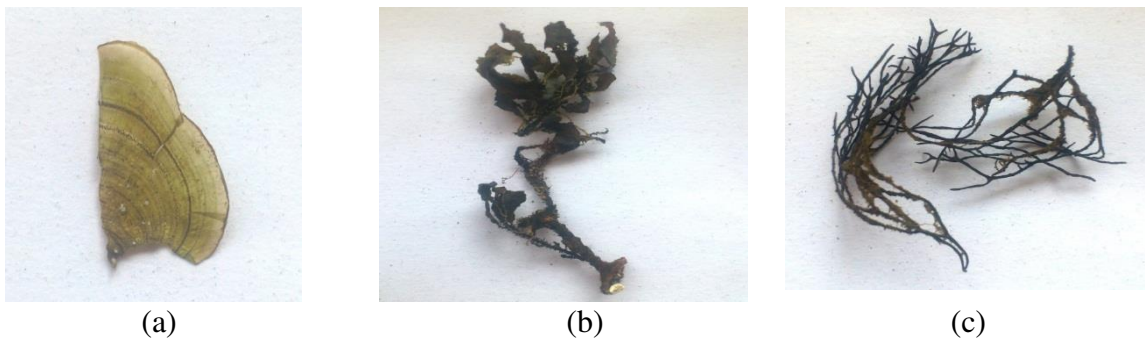
Endapan yang terdapat pada dasar sumur dibilas dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) 1x sebanyak dua kali. Larutan buffer PBS dibuat dari NaCl, KCl, Na₂HPO₄, dan KH₂PO₄, pH larutan buffer kemudian diatur hingga didapat pH 7. Biofilm yang terbentuk pada dasar sumur kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 60°C selama satu jam dengan tujuan fiksasi dan melekatkan endapan yang terbentuk pada dasar sumur. Sebanyak 100µl kristal violet kemudian ditambahkan ke dalam masing-masing sumur dan didiamkan selama dua menit untuk mewarnai biofilm, setelah itu dibilas dengan air suling steril hingga air bilasan jernih. Setelah cairan di dalam sumur dibuang, dilihat apakah ada pembentukan biofilm pada dasar sumur. Hal ini ditandai oleh adanya lapisan warna kristal violet pada dasar sumur yang dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Hasil uji ini kemudian dibandingkan

dengan hasil uji konfirmasi menggunakan agar tegak setengah padat. Jika produk ekstrasel isolat bakteri eksosimbion positif memiliki aktivitas antibakteri terhadap biofilm, maka tidak akan terbentuk lapisan warna kristal violet pada dasar sumur karena tidak terbentuk biofilm yang akan menyerap warna kristal violet, serta tidak akan ada pertumbuhan bakteri pada media agar tegak setengah padat. Banyaknya isolat bakteri eksosimbion yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap biofilm *S.aureus* kemudian dicatat dan dilakukan pengolahan data.

Hasil dan Pembahasan

Hasil Pengambilan dan Determinasi Makroalga

Sebanyak 3 jenis makroalga diperoleh dari Pantai Santolo, Kab.Garut, Jawa Barat. Temperatur air laut lokasi pengambilan sampel sebesar 33°C dengan pH air laut sebesar 7,8 dan salinitas sebesar 34,35 ppm. Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Dan Herbarium Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung yang hasilnya menunjukkan tiga jenis sampel makroalga yang didapat pada saat pengambilan sampel adalah *Padina sp.*, *Sargassum sp.*, dan *Gracilaria sp.* Morfologi ketiga sampel makroalga tersebut dapat dilihat pada gambar 1 dan tabel 1.



Gambar 1. Sampel tiga jenis makroalga yang digunakan

Figure 1 : Samples of three macroalgae used in research

Keterangan : a : *Padina sp.*
b : *Sargassum sp.*
c : *Gracilaria sp.*

Tabel 1. Morfologi Sampel Makroalga

Table 1. Morfology of Macroalgae

Kode Sampel	Nama Sampel	Morfologi
A	<i>Padina sp.</i>	Warna coklat kekuningan, permukaan sedikit rata, membentuk planar lebar, tidak dijumpai holdfast.
B	<i>Sargassum sp.</i>	Warna coklat hitam kekuningan, thallus bercabang, thallus planar di bagian apical, holdfast di bagian bawah.
C	<i>Gracilaria sp.</i>	Warna coklat kemerahan, thallus cabang berambut, holdfast terpusat di bagian bawah, apical bercabang dua, runcing.

Hasil Isolasi Bakteri Eksosimbion

Sebanyak 17 isolat koloni telah diisolasi dari tiga jenis makroalga yang ditemukan. Dari 17 isolat koloni tersebut, lima isolat koloni didapat dari *Padina sp.* (sampel kode A), lima isolat didapat dari *Sargassum sp.*

(sampel kode B) dan tujuh isolat koloni didapat dari *Gracilaria sp.* (sampel kode C). Hasil identifikasi morfologi dan bentuk sel isolat koloni tunggal bakteri eksosimbion dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Bentuk dan Morfologi Koloni Isolat Bakteri Eksosimbion Makroalga
Table 2. Colony Form and Morphology of Macroalga Exosymbiont Bacteria

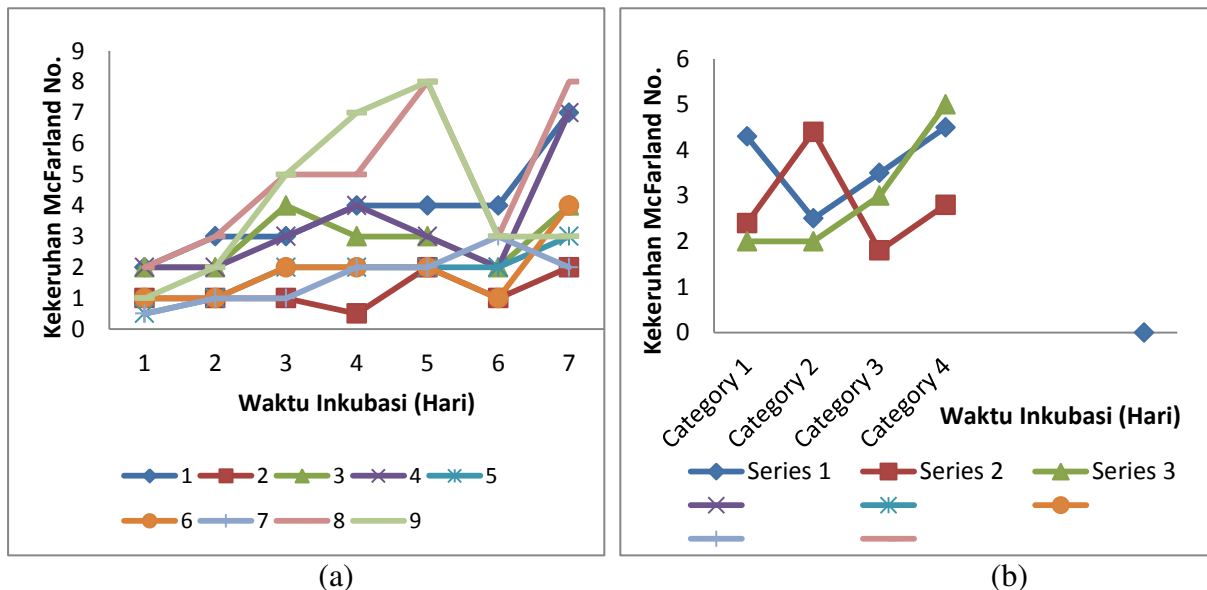
No Isolasi	Isolat Sampel	Bentuk Sel	Morfologi Koloni			
			Bentuk	Warna	Tepi	Permukaan
1	A1	Kokus	Bulat	Putih susu	Rata	Mengkilat
2	A2	Batang	Bulat	Putih susu	Rata	Mengkilat
3	A3	Kokus	Bulat	Merah muda	Rata	Mengkilat
4	A4	Kokus	Bulat	Putih susu	Rata	Mengkilat
5	A5	Batang	Bulat	Putih susu	Rata	Mengkilat
6	B1	Batang	Bulat	Kuning	Rata	Mengkilat
7	B2	Kokus	Bulat	Kuning	Rata	Mengkilat
8	B3	Batang	Bulat	Putih bening	Rata	Mengkilat
9	B4	Batang	Bulat	Putih bening	Rata	Mengkilat
10	B5	Batang	Bulat	Kuning	Rata	Mengkilat
11	C1	Kokus	Bulat	Orange	Rata	Mengkilat
12	C2	Batang	Bulat	Putih susu	Rata	Mengkilat
13	C3	Batang	Bulat	Putih susu	Rata	Mengkilat
14	C4	Kokus	Bulat	Kuning	Rata	Mengkilat
15	C5	Kokus	Bulat	Orange	Rata	Mengkilat
16	C6	Kokus	Bulat	Orange	Rata	Mengkilat
17	C7	Batang	Bulat	Kuning	Rata	Mengkilat

Keterangan : A = isolat bakteri sampel *Padina sp.*
B = isolat bakteri sampel *Sargassum sp.*
C = isolat bakteri sampel *Gracilaria sp.*

Hasil Isolasi Produk Ekstrasel Isolat Bakteri Eksosimbion

Produk ekstrasel isolat bakteri didapat dari inkubasi isolat bakteri dalam media Marine Broth selama tujuh hari. Setiap hari produk

ekstrasel tersebut diambil sehingga didapat produk ekstrasel isolat bakteri dari hari kesatu hingga hari ketujuh, untuk kemudian diuji skrining aktivitas antibakteri. Data kekeruhan suspensi isolat koloni bakteri eksosimbion dapat dilihat pada Gambar 2.



(a) Gambar 2. Kekeruhan suspensi isolat bakteri eksosimbion

Figure 2. Turbidity of exosymbiont bacteria suspension

Keterangan : (a) Grafik kekeruhan suspensi isolat 1 – 9 selama tujuh hari

(b) Grafik kekeruhan suspensi isolat 10 – 17 selama tujuh hari

Dari gambar 2, dapat diketahui bahwa pada variasi waktu terdapat tingkat kekeruhan suspensi bakteri yang berbeda. Tingkat kekeruhan suspensi bakteri sebanding dengan fase pertumbuhan bakteri yang terjadi selama waktu inkubasi. Fase pertumbuhan bakteri terdiri dari empat fase, yaitu fase lag, fase log, fase stasioner, dan fase kematian. Fase lag merupakan fase penyesuaian bakteri dengan lingkungan yang baru. Lama fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, suhu, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada media sebelumnya. Pada fase log, sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru maka sel mulai membelah hingga mencapai populasi yang maksimum, ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Fase stasioner terjadi pada saat laju Produk ekstrasel isolat bakteri eksosimbion yang digunakan untuk uji skrining aktivitas terhadap biofilm *S.aureus* adalah produk ekstrasel dari suspensi isolat bakteri yang telah mencapai fase stasioner, dimana telah terjadi akumulasi produk toksik yang dikeluarkan oleh isolat sel bakteri tersebut ke dalam media pertumbuhan. Produk toksik ini diduga memiliki aktivitas

pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah bakteri keseluruhan bakteri akan tetap. Hal ini dikarenakan oleh kadar nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik yang dikeluarkan oleh bakteri sehingga mengganggu pembelahan sel. Setelah fase stasioner, dilanjutkan dengan fase kematian yang diakibatkan oleh laju kematian yang lebih besar dari laju pertumbuhan sel bakteri. Hal ini menyebabkan terjadinya penurunan populasi bakteri (Volk & Wheeler, 1993). Tingkat kekeruhan 17 isolat koloni bakteri eksosimbion dari hari kesatu hingga hari ketujuh berbeda, menunjukkan bahwa setiap isolat bakteri memiliki sistem dan kecepatan metabolisme yang berbeda, sehingga waktu untuk tercapainya fase-fase pertumbuhan bakteri dari setiap isolat berbeda

antibakteri terhadap bakteri lain. Dari gambar 1 dapat diduga kapan fase stasioner tiap isolat bakteri telah tercapai, ditandai dengan kekeruhan suspensi isolat bakteri yang telah statis atau sebelum mengalami penurunan kekeruhan. Penurunan kekeruhan suspensi bakteri menandakan bahwa pertumbuhan bakteri telah memasuki fase kematian, sehingga terjadi

penurunan populasi bakteri (Volk & Wheeler, 1993). Rata-rata kekeruhan statis dari 17 isolat bakteri yang didapat terjadi setelah inkubasi setelah empat hingga enam hari.

Hasil Skrining Aktivitas Antibakteri Produk Ekstrasel Isolat Bakteri Eksosimbion Terhadap Bakteri Plankton S.aureus

Pengujian ini dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan teknik perforasi. Teknik ini memiliki kelebihan dapat

menguji beberapa sampel sekaligus dalam satu cawan uji (Jawetz *et al.*, 2005). Hasil uji aktivitas antibakteri produk ekstrasel isolat bakteri terhadap *S.aureus* ATCC 25923 plankton dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa produk ekstrasel isolat 10, 11, 12, dan 13 memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus* setelah inkubasi selama tiga hari, sedangkan isolat 9 baru menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus* setelah inkubasi selama lima hari. Hasil uji aktivitas antibakteri tersebut dapat dilihat pada gambar 3.

Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Produk Ekstrasel Isolat Bakteri Eksosimbion Terhadap *S.aureus* Plankton

Table 3. The result of Antibacterial Activity Test of Extracell Product of Exosymbiont Bacteria Againsts *S. aureus*

No Isolat	Aktivitas antibakteri pada inkubasi hari ke-						
	1	2	3	4	5	6	7
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	++	+	+
10	-	-	+	+	++	+	+
11	-	-	+	+	++	+	+
12	-	-	+	+	++	+	+
13	-	-	+	+	++	+	+
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : (+) = terbentuk zona hambat

(-) = tidak terbentuk zona hambat

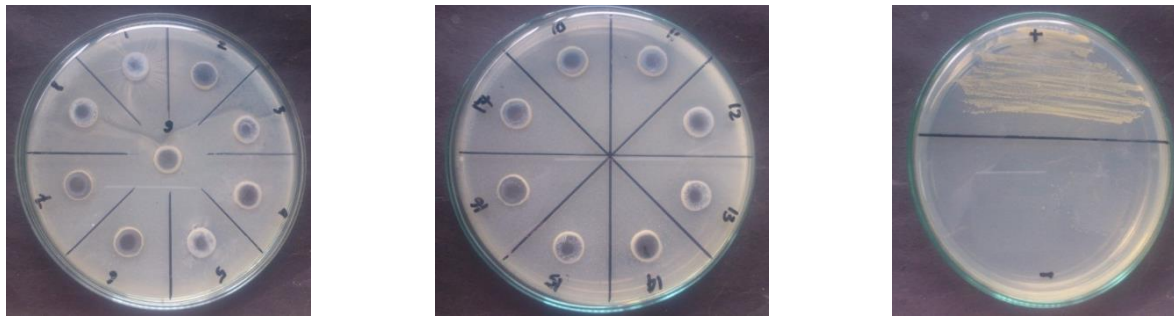
Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat 10, 11, 12, dan 13 telah memproduksi produk toksik sejak hari ke-tiga dan produk toksik terbanyak terakumulasi pada hari ke-lima. Sedangkan pada isolat 9, produk toksik diproduksi pada hari ke-lima. Berdasarkan data pada tabel tersebut, produk ekstrasel

dari 17 isolat koloni pada inkubasi hari ke lima digunakan untuk uji skrining aktivitas terhadap biofilm *S.aureus* ATCC 25923 dikarenakan aktivitasnya yang lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas hasil inkubasi pada hari lain. Hal ini diduga karena telah tercapai fase stasioner

pertumbuhan bakteri pada inkubasi hari ke-lima, dimana telah terjadi akumulasi produk toksik pada media pertumbuhan bakteri. Produk toksik inilah yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri lain.

Hasil Skrining Aktivitas Produk Ekstrasel Isolat Bakteri Terhadap Biofilm S.aureus

Produk ekstrasel isolat bakteri eksosimbion pada hari ke-5 digunakan untuk uji skrining aktivitas terhadap biofilm *S.aureus* ATCC 25923. Hasil uji uji skrining aktivitas terhadap biofilm *S.aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada gambar 3 dan Tabel 4.



Gambar 3. Hasil skrining aktivitas antibakteri produk ekstrasel isolat bakteri eksosimbion inkubasi isolat lima hari

Figure 3. The result of Antibacterial Activity Screening of Extracell Product of Exosymbiont Marine Bacteria (5 days incubation)

Tabel 4. Hasil Skrining Aktivitas Produk Ekstrasel Isolat Bakteri Terhadap Biofilm *S.aureus*

Table 4. The result of anti-biofilm activity of extracell product Againts *S.aureus* Biofilm

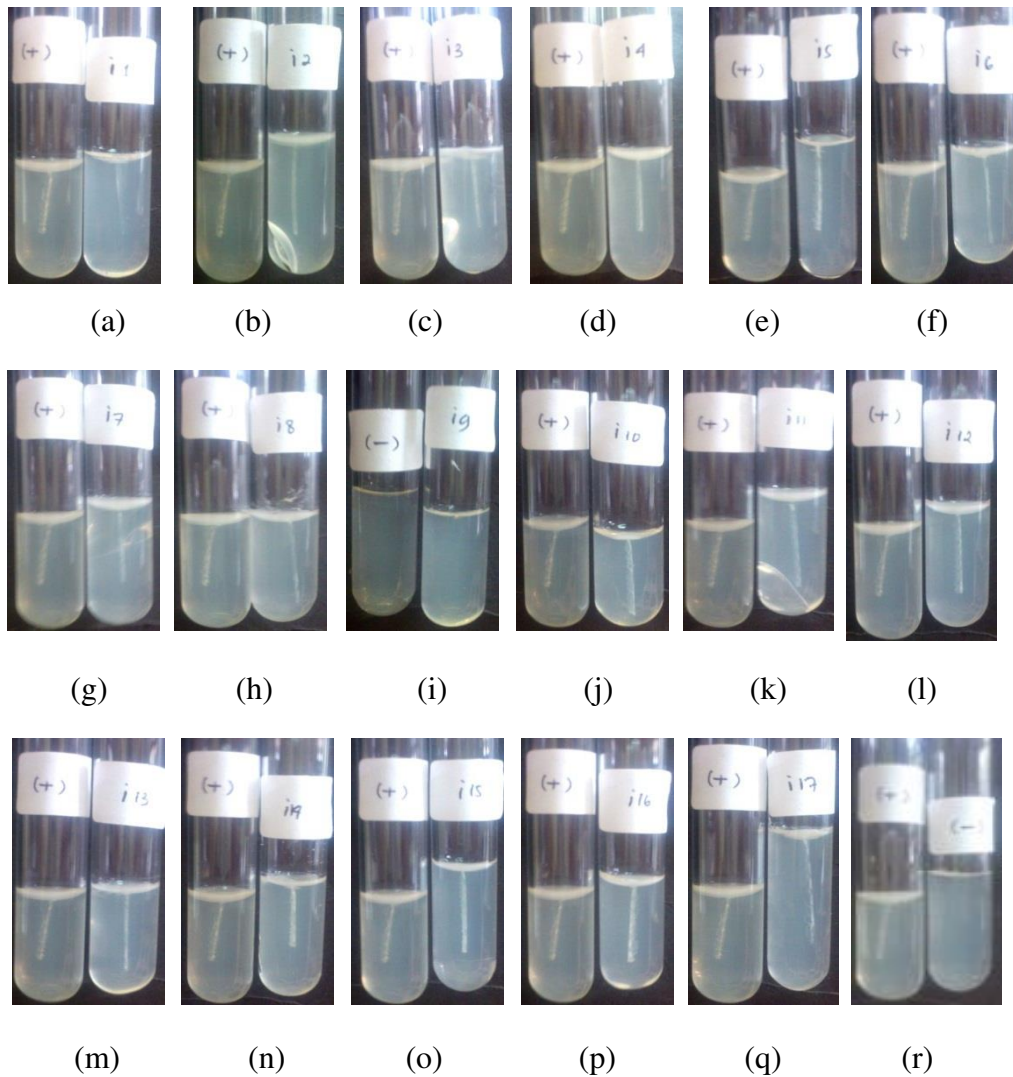
No Isolat	Endapan Terwarnai Kristal Violet
1	-
2	-
3	-
4	-
5	-
6	-
7	-
8	-
9	+
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	-
17	-

Keterangan : (+) = Ada aktivitas antibiofilm

(-) = Tidak ada aktivitas antibiofilm

Dari hasil uji skrining tersebut, diketahui bahwa isolat 9 memiliki aktivitas antibakteri terhadap biofilm *S.aureus* ATCC 25923 setelah dibandingkan dengan

kontrol negatif. Selain itu, hasil uji ini juga dikonfirmasi oleh hasil uji pada agar tegak setengah padat yang dapat dilihat pada gambar 4 dan Tabel 5.



Gambar 4. Hasil konfirmasi skrining aktivitas antibakteri terhadap biofilm *S.aureus* ATCC 25923 pada agar tegak

Figure 4. The confirmation result of Antibacterial Activity againsts *S.aureus* ATCC 25923 in tube agar

Keterangan : a = Isolat 1; b = Isolat 2; c = Isolat 3; d = Isolat 4; e = Isolat 5;
f = Isolat 6; g = Isolat 7; h = Isolat 8; i = Isolat 9; j = Isolat 10;
k = Isolat 11; l = Isolat 12; m = Isolat 13; n = Isolat 14; o = Isolat 15;
p = Isolat 16; q = Isolat 17; r = Kontrol positif dan negatif

Tabel 5. Hasil Uji Konfirmasi Aktivitas Antibakteri Terhadap Biofilm Pada Agar Tegak Setengah Padat

Table 5. *The confirmation result of Antibacterial Activity againts biofilm in tube agar*

No Isolat	Pertumbuhan Pada Media Agar Tegak Setengah Padat
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	+
9	-
10	+
11	+
12	+
13	+
14	+
15	+
16	+
17	+

Keterangan :

(+) = Ada pertumbuhan bakteri

(-) = Tidak ada pertumbuhan bakteri

Setelah dilakukan uji konfirmasi pada agar tegak setengah padat, dari tabel tersebut, diketahui bahwa pada isolat 9 menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat 9 positif memiliki aktivitas antibakteri terhadap biofilm *S.aureus* ATCC 25923.

Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari tiga jenis makroalga, diperoleh 17 isolat koloni tunggal yang memiliki warna dan morfologi koloni yang berbeda. Dari 17 isolat tersebut diperoleh lima isolat koloni, yaitu isolat 9,10,11,12,dan 13, yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus* ATCC 25923 plankton dan satu isolat koloni, yaitu isolat 9, yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bentuk biofilminya.

Daftar Pustaka

- Ali, A.I.B., M.E. Bour, L. Ktari, H. Bolhuis, M. Ahmed, A. Boudabbous, and L.J.Stal. 2012. Jania rubens-associated bacteria: molecular identification and antimicrobial activity. *J Appl Phycol*. 24:525–534
- Armstrong,E., L. Yan, K.G. Boyd, P.C. Wright, andJ.G. Burges. 2001. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia* .461: 37–40
- Ceri, H., M.E. Olson, C. Stremick, R.R. Read,D. Morck, and A.Buret. 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*. 37:1771-6
- Daum, R.S. 2008. Staphylococcus aureus vaccines. In: Plotkin, S.A.,

- Orenstein, W.A., Offit, P., editors. *Vaccines*. 5th ed. Philadelphia. Saunders Elsevier. 1307-15
- Donlan, R. M. and J. W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:167–193
- Jawetz M; Adelberg's. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 23. Alih Bahasa: Huriwati Hartanto dkk. Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta.
- Jennings, J.A., H.S. Courtney, and W.O. Haggard. 2012. Cis-2-decenoid acid inhibits *S.aureus* growth and biofilm in vitro: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res.* 470: 2663-2670
- Leid, J. G., M. E. Shirtliff, J. W. Costerton, and A. P. Stoodley. 2002. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect. Immun.* 70:6339–6345.
- Lemos, M.L., A.E. Toranzo, and L.J. Barja. 1986. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microb Ecol.* 11: 149-163
- Manmadhan, K., S. Hideaki, S. Haldar, S. Yamasaki, and S. Nagata. 2006. Antibacterial activities of marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of Japan. *Ann. Microbiol.* pp 167-173
- Manmadhan, K., S. Hideaki, and N. Shinichi. 2007. Phylogenetic identification of epibiotic bacteria possessing antimicrobial activities isolated from red algal species of Japan. *World J Microbiol Biotechnol.* 24:2315–2321
- Nishimura, S., T. Tsurumoto, A. Yonekura, A. Adachi, and H. Shindo. 2006. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases. *J Orthop Sci.* 11:46–50
- O'Toole, G., H.B. Kaplan, and R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 54:49-79.
- Ruiz, J.P., C. Vidallac, and M.J. Rybak. 2012. Macrolides and staphylococcal biofilms. *Rev Esp Quimioter.* 25(1):10-16